

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152540

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

透析法制备载羟基喜树碱-聚乳酸
纳米粒及其性能研究

Preparation and evaluation of hydroxycamptothecin-loaded
poly (D,L-lactic acid) nanoparticles using dialysis method

罗 颖

指导教师姓名: 张其清 教授/博导
侯振清 讲师

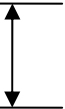
专 业 名 称: 药物化学

论文提交日期: 2010 年 月

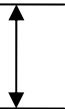
论文答辩日期: 2010 年 月

2010 年 5 月

直接透析法制备载羟基喜树碱-聚乳酸纳米粒及其性能研究
罗颖
指导教师 张其清 教授、博导 侯振清 讲师
厦门大学



2.5cm



2.5cm

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

透析法制备聚合物缓释纳米粒, 工艺简单并且可以避免使用表面活性剂, 易于工业化生产。因此, 受到人们越来越多的关注。

羟基喜树碱(HCPT)是从中国特有的珙桐科植物喜树中分离出的一种吲哚类生物碱, 它能够通过抑制拓扑异构酶 I 而抑制肿瘤细胞的增殖, 对非小细胞肺癌、腹水型肝癌、胃癌、及白血病有一定疗效, 为广谱抗肿瘤药物。临床上主要剂型为注射用水针剂的开环羧酸盐 HCPT, 因其临床疗效低、半衰期短等缺点限制了该制剂的应用。为了提高该药的生物利用率, 减小毒副作用, 本文以 D,L-PLA 为药物载体, 以闭环 HCPT 为模型药物, 采用直接透析法制备载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒, 并考察其体外释放性能、细胞毒性及体内抑瘤效果。

研究结果如下:

1) 制备了载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒: 以 HCPT-PLA 纳米粒粒径(符合静脉注射要求 $\approx 200\text{nm}$)和载药率为评价标准, 通过正交实验设计 $L_9(3^3)$ 考察 D,L-PLA 浓度、HCPT 与 PLA 质量比及不同截留分子量(MWCO)透析袋对其指标的影响; 确定了 HCPT-PLA 纳米粒的最佳工艺: 即室温条件下以 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂, PLA 浓度为 2 mg/mL , HCPT 与 PLA 质量比为 1:5, 截留分子量为 3500 的透析袋, 透析时间为 10 h;

2) 进行了 HCPT-PLA 纳米粒的表征: 用动态光衍射(DLS)、扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)、紫外光谱分析(UV)、激光共聚焦显微镜(CLSM)、粉末 X-射线衍射仪(XRD)和差示扫描量热仪(DSC)对 HCPT-PLA 纳米粒的粒径、稳定性、形态及状态进行了鉴定, 结果表明 HCPT-PLA 纳米粒为表面圆滑的实心球体, 药物以晶体状态均匀分布于聚乳酸纳米粒中;

3) 考察了 HCPT-PLA 纳米粒的体外释药性能: 药物的释放速率有明显 pH 值依赖性, pH 值越高, 药物释放速度越快且释药曲线符合 Huguichi 方程;

4) MTT 试验检测了细胞毒作用: 体外细胞培养实验采用人肝癌细胞(BEL-7402), MTT 结果显示, 空白 PLA 纳米粒对该细胞无细胞毒作用, 对比空白 PLA 纳米粒与 PBS 空白对照组 *A* 值差异均无统计学意义($p>0.05$)。实验组结

果显示, 纯 HCPT 及 HCPT-PLA 纳米粒均具有明显浓度依赖性细胞毒作用且 HCPT-PLA 纳米粒的生长抑制率略高于纯 HCPT。

5) 体内抑瘤率试验: 以 H22 肝癌实体瘤的昆明雄性小鼠为实验模型, 通过尾静脉注射方式考察 HCPT-PLA 纳米粒体内抑瘤效果。结果显示: HCPT-PLA 纳米粒在体内具有较好的抑瘤活性且抑瘤效果高于同剂量的纯 HCPT。抑瘤效果无明显的量效关系。

关键词: 透析法 羟基喜树碱 聚乳酸纳米粒 体外释放 细胞毒性试验 抑瘤率

Abstract

Dialysis method was developed to prepare polymer particles in recent years. Dialysis method is an acceptably simple and effective method for preparation particles without the additional surfactants, which is expected to apply in industrial production.

10-hydroxycamptothecin (HCPT) is a promising broad-spectrum antitumor agent that targets the nuclear enzyme topoisomerase I and has achieved remarkable success in early clinical trials. However, the clinical application of HCPT was largely hampered because of its poor solubility and stability, which led to low therapeutic efficiency and a number of side effects to normal tissues such as neutropenia, thrombocytopenia, and diarrhea owing to the conversion of HCPT from active lactone form to the inactive carboxylate form under physiologic conditions. Therefore, finding suitable formulations for the delivery of the HCPT is of great significance in fully unleashing the potential of HCPT drug.

The contents are summarized as follows:

1) **Preparation of HCPT-loaded PLA nanoparticles:** in this work, our aim was to obtain the nanoparticles of desired size range (about 200 nm) and highest drug-loading content. For this purpose, an orthogonal L9 (3^3) test design was used to investigate the optimal formulation condition. The analysis results of orthogonal test performed by statistical software SPSS 13.0 are presented as follow: organic solvent: DMF; PLA concentration: 2 mg/mL; the ratio of HCPT to PLA: 1:5 (wt/wt); dialysis bag: MWCO 3500, time: 10 h.

2) **Physicochemical characterizations of HCPT-loaded PLA nanoparticles:** the obtained HCPT-PLA nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM)/transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and confocal laser scanning fluorescence microscope (CLSM). Based on these experimental results, it was proposed that the distribution of HCPT in PLA nanoparticles was very uniform and HCPT was a crystalline state existed in PLA nanoparticles.

3) **In vitro release studies:** It is worth noting that there was no obvious burst effect of HCPT releasing from the PLA nanoparticles and the release profiles show pH dependence. The higher the PH value, the faster the release of HCPT from the

nanoparticles. The mean in vitro cumulative release percentage of HCPT from HCPT-loaded PLA nanoparticles vs. time curve fitted well with the Higuchi Equation.

4) **In vitro cytotoxicity assay:** Cytotoxicity test indicated that the HCPT-loaded PLA nanoparticles had enhanced in vitro cytotoxicity against human liver BEL-7402 cells compared to the commercially available HCPT injection and it was obvious that the growth-inhibitory effect was concentration dependent.

5) **In vivo antitumor effect in H22 bearing KunMing male mice:** the in vivo antitumor effect in H22-bearing KM male mice after i.v. injection of the HCPT-loaded PLA nanoparticles showed that the HCPT-loaded PLA nanoparticles exhibited superior antitumor effect compared to the free HCPT.

These obtained results are promising for preparing nanoparticles for entrapping HCPT, which emphasize the potential of HCPT-loaded biodegradable nanoparticles for cancer chemotherapy.

Key words: Poly D,L-lactic acid(PLA); hydroxycamptothecin(HCPT); nanoparticles; dialysis; MTT; tumor inhibition rate

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 绪论	1
第二章 空白/载药聚乳酸纳米粒的制备及表征	20
2.1 引言	20
2.2 实验部分	21
2.3 结果与讨论	27
2.3.1 制备条件对空白聚乳酸纳米粒粒径大小的影响	27
2.3.2 正交实验对制备条件的优化及分析	28
2.3.3 空白/载药聚乳酸纳米粒的表征	31
2.4 结论	43
第三章 载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒的体外体内试验	45
3.1 引言	45
3.2 仪器与材料	45
3.3 实验方法	47
3.4 结果与讨论	49
3.4.1 载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒的灭菌	50
3.4.2 载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒的细胞毒性试验及形态学变化	51
3.4.3 载羟基喜树碱聚乳酸纳米粒治疗 H22 肝癌实体瘤的药效学实验 ...	52
3.5 结论	55
结论和展望	57
参考文献	60
致 谢	67

Table of contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 The preparation and Characterization of blank/HCPT-loaded PLA nanoparticles	20
2.1 Foreword	20
2.2 Experiments	21
2.3 Results and disscussion	27
2.3.1 Influence of preparation conditions on the size of blank PLA nanoparticles	27
2.3.2 Orthogonal optimization of preparation conditions and analysis	28
2.3.3 The characterization of blank/HCPT-loaded PLA nanoparticles	31
2.4 Conclusion.....	43
Chapter 3 The in vivo and in vitro test of HCPT-loaded PLA nanoparticles	45
3.1 Forword.....	45
3.2 Apparatus and Materials	45
3.3 Experiment methods	47
3.4 Results and disscussion	49
3.4.1 The sterilization of HCPT-loaded PLA nanoparticles.....	50
3.4.2 The cytotoxicity test and cell morphological changes	51
3.4.3 The pharmacodynamic study of HCPT-loaded PLA nanoparticles	52
3.5 Conclusion.....	55
Conclusion and prospect	57
Reference.....	60
Acknowledgement	67

第一章 绪论

1.1 药物缓释制剂简介

缓释制剂(sustained release preparation, SRP)系指药物在一定的释放介质中, 按要求缓慢地非恒速释放, 与其相应的普通制剂比较, 给药频率减少一半或有所减少, 且能显著增加患者顺应性的制剂。缓释制剂是第三代药物制剂, 它克服了常规制剂一日给药频繁、使用不便而血药浓度起伏很大、有“峰谷”现象、不良反应多等缺点, 可较持久释放药物, 因而被广泛用于治疗多种疾病^[1]。

药物缓释、控释制剂作为一种较新的剂型与普通剂型相比具有高效、低毒、可控、提高病人耐受性等优点, 并且研发周期短、研发费用低。由于使用该类药物可以减少用药量和用药次数, 降低血浓峰谷现象, 减轻病人的毒副作用, 提高疗效和安全度^[2]。因此, 国际上已经将该类药物的研究开发列入新药开发的重点。随着经济和科学技术的发展, 新辅料、新材料、新设备和新工艺的不断涌现及药物载体的修饰等, 为药剂工作者在缓控释制剂领域的探索和发展提供了广阔空间^[3-6]。

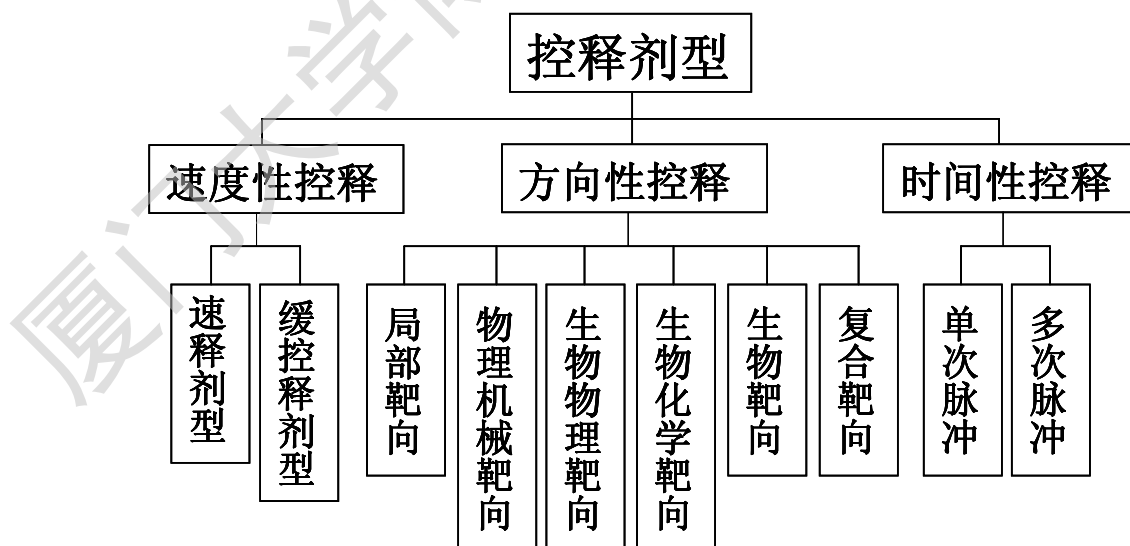


图1.1 控释制剂分类

Fig.1.1 Classification of controlled-release formulations

缓释制剂按剂型可分为片剂、胶囊剂、膜制剂、眼用制剂、微球、微丸、注射植入剂等。

片剂(tablets)是指药物与辅料均匀混合后压制而成的片状制剂,其外观有圆形的,也有异形的(如椭圆形、三角形、菱形等)。片剂以其服用方便,制备工艺相对简单,质量易于控制等优点成为缓释制剂研究开发应用最广、技术最成熟的一个剂型。

胶囊剂(capsules)是指将药物填装于空心硬质胶囊中或密封于弹性软质胶囊中而制成的固体制剂。上述硬质胶囊壳或软质胶囊壳的材料都由明胶、甘油、水以及其它的药用材料组成。由于胶囊具有能掩盖药物的不良嗅味,提高药物稳定性,药物在体内起效快,将液态药物固体化等特点而被广泛应用。

膜剂(films)系指药物溶解或均匀分散于成膜材料中加工成的薄膜制剂。根据膜剂的结构类型分类,有单层膜、多层膜(复合)与夹心膜等。膜剂的形状、大小和厚度等视用药部位的特点和含药量而定。膜剂的特点:工艺简单,生产中没有粉末飞扬;成膜材料较其他剂型用量小;含量准确;稳定性好;吸收快;膜剂体积小,质量轻,应用、携带及运输方便。采用不同的成膜材料可制成不同释药速度的膜剂,既可制备速释膜剂又可制备缓释或恒释膜剂。缺点是载药量小,只适合于小剂量的药物,膜剂的重量差异不易控制,收率不高。

脂质体(liposomes)是一种由排列有序的脂质双分子层组成的多层微囊,具有类似生物膜双分子层的近晶结构,大小通常为几十纳米到几十微米。脂质体的主要成分是磷脂,如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)等,磷脂分子中含极性磷酸基团和两个非极性长碳氢链,这种结构使脂质体具有亲水亲油性。在特定浓度条件下,磷脂的极性头部与极性头部相结合,非极性尾部与非极性相结合,形成一个稳定的双分子层结构。所以脂质体既可以包裹亲脂性物质,也可以包裹亲油性物质。制备脂质体除了常用磷脂外,还包括胆固醇、大豆甾醇及其葡萄糖苷。

脂质体制备的关键是采用温和手段使磷脂形成均匀的脂质体,达到需要的大小和形成合适的结构,并保证被包封的药物具有较好的活性和较高的包封率,且不易从脂质体中渗漏。脂溶性药物和水溶性药物通常采用的制备方法不同,采用挤出及冻干设备生产脂质体以及采用空白脂质体包合是发展脂质体的重要工艺

改进。

与其他剂型相比,脂质体主要有以下特点:1) 制备工艺相对简单,已可规模化生产;2) 脂质体多采用磷脂为膜材,可生物降解,生物相容性好,无毒,可血管内给药;3) 同一脂质体可包封脂溶性和水溶性两种类型药物;4) 脂质体具有多重靶向性(如被动靶向、物理化学靶向及主动靶向性等);5) 组织细胞相容性。

微囊系指利用天然的或合成的可生物降解高分子材料(囊材)作为囊膜壁壳,将固体药物或液态药物(囊心物)包裹而成药库型的微囊。微球系指药物与高分子材料制成的基质骨架的微小球状实体或类球形实体。药物微囊化目的:掩盖药物的不良气味及口味;提高药物的稳定性;防止药物在胃内失活或减少对胃的刺激;使液态药物固态化便于应用与贮存;减少复方药物的配伍变化;可制备缓释或控释制剂;使药物浓集于靶区,提高疗效,降低毒副作用;可将活细胞或生物活性物质包裹。微囊化技术的进展可分为几个阶段:1) 20世纪80年代以前主要应用粒径为 $5\mu\text{m}\sim 2\text{mm}$ 的小丸;2) 20世纪80年代发展了粒径小($0.01\sim 10\mu\text{m}$)的第二代产品,这类产品通过非胃肠道给药时,被器官或组织吸收能显著延长药效、降低毒性、提高活性和生物利用度。3) 主要是纳米级胶体粒子的靶向制剂,即具有特异的吸收和作用部位的制剂。

1.2 可生物降解高分子材料

可生物降解高分子材料(Biodegradable polymeric materials)是指在一定的时间和一定的条件下,能被微生物(细菌、真菌、霉菌、藻类等)或其分泌物在酶或化学分解作用下发生降解的高分子材料。生物降解的高分子材料具有以下特点:易吸附水、含有敏感的化学基团、结晶度低、低分子量、分子链线性化程度高和较大的比表面积等^[7-11]。

1.2.1 可生物降解高分子材料分类

可生物降解的高分子材料可以粗分为以下几类^[12-16]:1) 天然高聚物(如淀粉、甲壳素、纤维素及其衍生物等);2) 聚酯(包括微生物合成的聚- β 羟基丁酸);3) 水溶性聚合物(聚乙烯醇、聚乙二醇、聚丙烯酸低聚物等);其他合成型聚合物

如尼纶6低聚物, 聚-L赖氨酸等)。可生物降解高分子材料的应用领域可生物降解高分子材料的应用范围极为广泛, 涵盖农业、林业、渔业、包装业、纺织业以及近年来的研究热点生物医学领域。

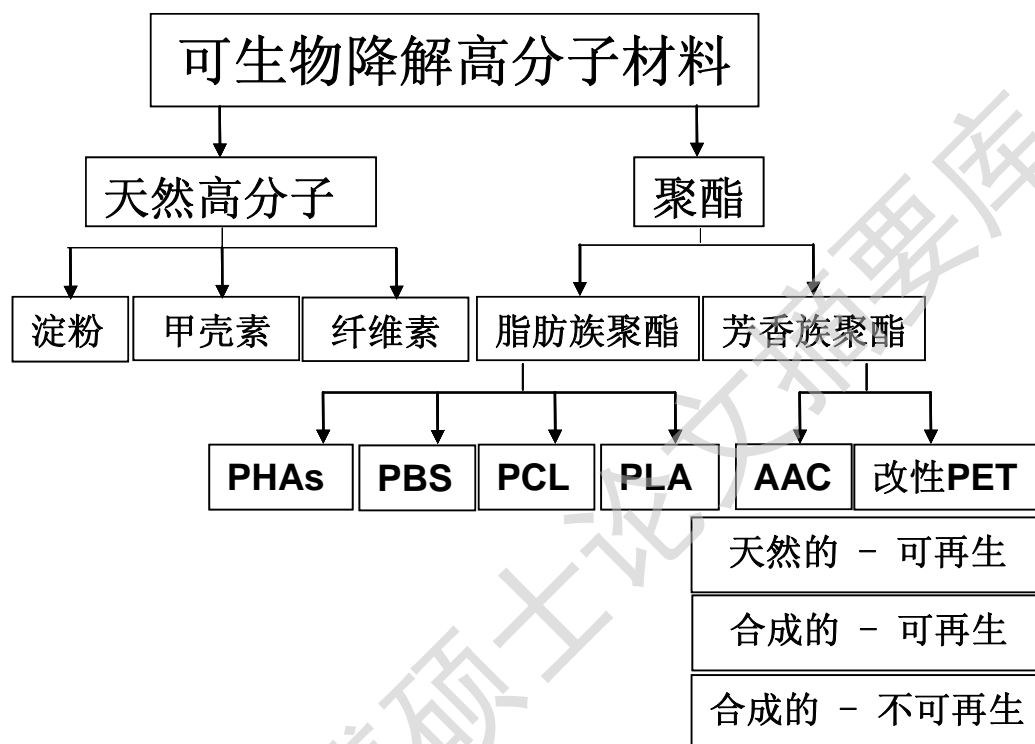


图1.2 可生物降解高分子材料分类

Fig.1.2 Classification of biodegradable polymeric materials

生物医学材料必须具备以下两个条件：一、要求材料与组织短期接触时无毒性, 无致敏、无致炎、无致癌作用、无其他不良反应。二、应具备耐腐蚀性及相应的生物力学性能和良好的加工性能。

1.2.1.1 天然高分子材料

天然高分子材料因具有性能稳定、无毒、应用安全、生物相容性好及成膜或成球性好、价格低廉等优点, 常被用来作为药物的载体材料。常用的有以下几种：
(1) 淀粉 有 $\alpha(1-4)$ 联接的聚糖直链淀粉和通过 $\alpha(1-4)$ 和 $\alpha(1-6)$ 联接成高度支化的支链淀粉两种。这两种联接都比 $\beta(1-4)$ 联接弱。所以, 在活体组织中, 淀粉是可吸收的。但是, 淀粉的热塑性很差, 而亲水性过强, 使其加工成型变得非常困难。因此, 通常需要合成淀粉的衍生物, 或与其它高聚物共混, 如与聚乙烯、聚氯乙烯

烯、聚丙烯等共混，可以形成生物降解性能良好的高分子材料。

(2) 纤维素 其结构重复单元的 β -(1-4)聚葡萄糖酐是非常稳定的联接，也易于形成氢键。因而，天然纤维素材料强度高，难以被大多数有机体所消化。不过，有两类纤维素材料经过结构改性而在工业上得到了广泛应用：一类是再生纤维素，另一类是化学改性纤维素。

(3) 甲壳质 是由2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖通过 β (1, 4)苷键连接而成的线性聚合物，普遍存在于虾、蟹、昆虫等动物的壳内，是自然界中唯一呈碱性的多糖。由于具有高结晶度与较多的氢键，甲壳质的溶解性能很差，只能被一些强质子酸所溶解。但甲壳质在碱性条件下脱乙酰成为甲壳胺(壳聚糖)，其溶解性能比甲壳质好。甲壳质经过酰胺化、羧基化、氰基化、酸化改性，提高了溶解性，现在医疗上可用作外科手术线、人造皮肤等。其生物相容性、生物活性优异，生物降解性好，降解产物无毒，还具有许多独特的性质如抗菌、抗微生物、促进伤口愈合等等。

(4) 明胶 是氨基酸与肽交联形成的直链聚合物，聚合度不同的明胶具有不同的分子量，其平均分子量 M_{av} 在15000~25000之间。因制备时所用水解方法不同，分为酸法水解明胶(A型)明胶和碱法水解明胶(B型)明胶。B型明胶稳定而不易长菌但两者的成囊性无明显差别。通常可根据药物对酸碱度的要求而选用A型明胶或B型明胶。

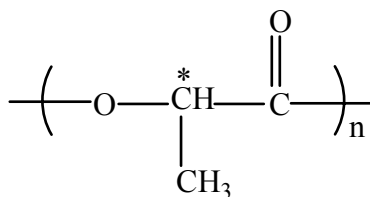
(5) 海藻酸盐 系多糖类化合物，常用稀碱从褐藻中提取而得。海藻酸钠可溶于不同温度的水中，不溶于乙醇、乙醚及其他有机溶剂；不同 M_{av} 产品的粘度有差异。也可与聚赖氨酸合用做复合材料。因海藻酸钙不溶于水，故海藻酸钠可用氯化钙固化成囊。

1.2.1.2 合成高分子材料

聚酯类是迄今研究最多、应用最广的生物可降解合成高分子，它们基本上都是羟基酸或其内酯的聚合物。目前开发的主要产品有羟基酸缩合物-聚乳酸(PLA)、羟基乙酸缩合物-PGA(poly glycolic acid)、由乳酸与羟基乙酸直接缩合到的PLGA、聚己内酯(PCL)、聚丁二醇丁二酸酯(PBS)等。除了脂肪族聚酯外，多酚、聚苯胺、聚碳酸酯、聚天冬氨酸等也已相继开发成功。其中，FDA批准的体内可降解材料有PLA和PLGA。

(1) 聚乳酸 (PLA)

结构式如图:



其分子中有一个不对称碳原子, 因此有两种光学异构体, 可形成四种不同构型的聚合物: 两种立体规整性构型, 右旋聚乳酸(PDLA)和左旋聚乳酸(PLLA), 一种外消旋的聚乳酸(PDLLA)以及很少应用的内消旋的聚乳酸。是一种具有优良的生物相容性和生物降解性的聚合物, 经FDA批准可用做医用手术缝合线和注射用微胶囊、微球及埋植剂等制剂的材料。PLA在体内代谢最终产物是CO₂和H₂O, 中间产物是乳酸, 也是体内正常代谢的产物, 不会在重要器官聚集。所以早在50年代就开始了PLA的合成及应用研究, 近年来, 随着纳米粒子的发展, PLA也进入了应用于药物载体研究阶段。

由于PLLA分子中的不对称碳链为规整构型, 因而形成半结晶聚合物, 熔点约185 °C, 具有优良的力学强度并且降解吸收时间很长(一般为3 ~ 3.5年), 适用于承载的装置, 是制作内植骨固定装置的理想材料。与此相反, PDLLA分子中的不对称碳链为非规整结构, 是无定形聚合物, T_g 约65 °C, 降解和吸收速度较快, 一般为3 ~ 6个月。这种聚乳酸有利于药物均匀分布在基质中, 因此非常适用于药物释放系统, 主要作药物控释的载体和软组织修复材料。其应用主要包括: 骨科内固定物, 组织修复材料, 手术缝合线及药物缓释控释体系。

(2) 聚羟基乙酸(PGA) 由乙交酯开环聚合制得, 降解后生成羟基乙酸。由于羟基乙酸和乳酸都是体内三羧酸循环的中间代谢物, 且吸收和代谢机理已经明确并具有可靠的生物安全性, 因而聚羟基乙酸和聚乳酸一样做为第一批可降解吸收材料被FDA批准用于临床。PGA具有简单规整的分子结构, 形成结晶状聚合物。结晶一般为40 ~ 50 %, 熔点约225 °C。它不溶于常用的有机溶剂, 只溶于六氟异丙醇这样的强极性溶剂。可熔融纺丝加工成高强度纤维, 开始是专为可吸收缝合线而研究的, 由它制成了世界上第一个合成可吸收缝线“Dexon”。用PGA制作的内植骨钉已有商品(Biofix), 但由于高结晶度和难溶解性, PGA均聚物不适合作药物控释载体。

(3) PGA主结构共聚物 可大大改善物理性能, 最成功的是羟基乙酸和乳酸

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库